

KRYOKONSERVIERUNG VON MÄUSEEMBRYONEN
EIN VERGLEICH ZWISCHEN DEN GEFRIERSCHUTZMITTELN
DMSO UND GLYZERIN

von
Margit Köhnlein-Rühl geb. Köhnlein
aus
Nürnberg

Diss. Erlangen
1984

1984 № 260



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546217_0078

Aus der Klinik für Frauenheilkunde
mit Poliklinik und Hebammenschule
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. K. G. Ober

KRYOKONSERVIERUNG VON MÄUSEEMBRYONEN

EIN VERGLEICH ZWISCHEN DEN GEFRIERSCHUTZMITTELN DMSO UND GLYZERIN

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Margit Köhnlein-Rühl geb. Köhnlein
aus
Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf
Referent: Prof. Dr. S. Trotnow
Korreferent: Prof. Dr. H. Egger

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.1984

GEWIDMET MEINEN ELTERN
IN LIEBE UND DANKBARKEIT

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
I.1. Grundsätzliches zur Kryokonservierung	2
I.2. Variable Faktoren beim Tiefgefrieren	5
II. MATERIAL UND METHODE	14
II.1. Tiermaterial	14
II.2. Embryonengewinnung und Embryonenbearbeitung	14
II.2.1. Nährmedium	14
II.2.2. Superovulation	15
II.2.3. Gewinnung der Embryonen	16
II.2.4. Beurteilungskriterien vor und nach der Kryokonservierung	17
II.3. Technisches Material	20
II.3.1. Gefriergutbehälter	20
II.3.2. Einfriergerät	20
II.4. Kryoprotektivum	23
II.5. Technik des Einfrierens	25
II.5.1. Ermittlung der individuellen Seedingtemperatur	25
II.5.2. Programmierung des Einfriergerätes	26
II.6. Technik des Auftauens	27
II.7. Embryotransfer	28
II.7.1. Instrumente	28

	Seite
II.7.2. Vorbereitung der Embryonen zum Transfer	29
II.7.3. OP-Technik beim Transfer	29
II.8. Laparotomie zur Feststellung der Implantationen	30
II.9. Überprüfung der neugeborenen Mäuse	31
III. ERGEBNISSE	32
III.1. Versuchsgruppe I: Kryoprotektivum DMSO	32
III.2. Versuchsgruppe II: Kryoprotektivum Glycerin	43
IV. DISKUSSION	53
V. ZUSAMMENFASSUNG	63
VI. LITERATURVERZEICHNIS	66

I. EINLEITUNG

Unerfüllter Kinderwunsch ist eines der fundamentalen Probleme der humanmedizinischen Forschung. Die Ursachen der Kinderlosigkeit sind vielfältig und komplex. Ein Weg zu ihrer Bewältigung kann die extrakorporale Befruchtung sein. Trotz der gerade in den letzten Jahren zu verbuchenden Erfolge ist diese Methode noch lange nicht ausgereift; die vielen Einzelschritte bedürfen noch sorgfältiger Verbesserungen. Die Einnistung des extrakorporal befruchteten Eies in den Uterus ist zum Beispiel einer dieser schwierigen Einzelschritte. Die Synchronisierung des graviden Uterus und des in vitro gewachsenen Embryos zum Zeitpunkt der vorgesehenen Implantation ist ein problematischer Bereich. Zur Synchronisierung kann die Tiefgefrierkonservierung für einen Zyklus eingesetzt werden, um so den richtigen Zeitpunkt der Reimplantation besser bestimmen zu können und das Risiko einer Abstoßung auf Grund hormoneller Asynchronität zu verhindern. Im Tierexperiment ist dieser Gedanke schon seit vielen Jahren in die Tat umgesetzt worden.

1972 gelang Whittingham et al. erstmals die Langzeitkryokonservierung von Mäuseembryonen. Zahlreiche weitere Gruppen versuchten dann im letzten Jahrzehnt die mannigfaltigen Probleme der Kryokonservierung auch bei anderen Spezies zu lösen, da auch in der Tiermedizin die Tiefgefrierkonservierung viele Wege öffnen kann.

I.1. Grundsätzliches zur Kryokonservierung

Zuerst sollen einige grundsätzliche Überlegungen zur Tiefgefrierkonservierung erörtert werden.

Schon 1958 berichteten Sherman und Teh Ping Lin über erste Erkenntnisse beim Einfrieren und Auftauen von unfertilisierten Mäuseeizellen. Es wurde noch keine Langzeitkryokonservierung betrieben, sondern nur Temperaturen von -10°C für maximal 3,5 Stunden erreicht, jedoch konnten wichtige Vorgänge und grundlegende Tatsachen aufgezeigt werden.

Gefrieren bedeutet für Sherman nur "Überleben in Anwesenheit von extrazellulärem Eis ohne intrazelluläre Eisbildung". Er konnte beobachten, daß Zellen mit interner Eisbildung

geschädigt werden. Die Eisbildung geht aber nicht gleichmäßig vor sich, sie weist Unterschiede von 1 - 15 Sekunden bezogen auf den Tiefenvektor auf. So kommt es, daß die Kummuszellen allein gefrieren, nicht aber die Oocyte selbst.

Mazur konnte diese These 1970 bestätigen, indem er erkannte, daß Zellen bis -10°C bzw. -15°C nicht gefrieren, auch wenn sich außerhalb Eis befindet, sondern nur unterkühlt bleiben. Unterhalb dieser Temperaturen kommt es zur Äquilibration des Zellinneren mit der Umgebung, da innerhalb der Zelle ein höherer Dampfdruck gegenüber dem sich außerhalb befindlichen Eis besteht und es dadurch zur Dehydratation kommt.

Der Wasserverlust der Zelle bewirkt eine Konzentrations-
erhöhung der Elektrolyte und somit eine osmotische Druck-
steigerung, welche die Ursache für eine Zellschädigung sein
kann. Dieser Vorgang kann entweder beim langsamen Frieren
oder bei einer hohen Wasserpermeabilität der Zellmembran ein-
treten. Beim schnellen Einfrieren oder einer niedrigen Wasser-
permeabilität kann jedoch die Dampfdruckdifferenz nicht ausge-
glichen werden, d.h. die Dehydratation wird verhindert und
es kommt zur internen Eisbildung (Mazur 1970).

Ein weiterer kritischer Punkt ist das sogenannte "Seeding".

Damit ist die spontane Eisbildung mit nachfolgender Temperatursteigerung durch die Wärmeabgabe während der Phasenänderung gemeint. Zur Schädigung der Zelle während des

Seeding kommt es jedoch erst bei Temperaturen ab -7°C

(Whittingham 1977a). Man ist also bestrebt das Seeding in

Temperaturbereichen oberhalb von -7°C auszulösen, um diese Gefahr der Verletzung für die Zelle zu vermeiden.

Nicht nur das Einfrieren selbst kann zur Zellschädigung führen, auch beim Auftauen können Schäden auftreten.

Lovelock konnte schon 1954 einen dieser Mechanismen an Erythrozyten beobachten. Die hohen Elektrolytkonzentrationen, die bei der Dehydratation auftreten, können die Lipide der Membranoberfläche schädigen. Durch die dadurch entstandenen Lücken strömen beim Auftauen, dem Vorgang der Reexpansion, hochkonzentrierte Lösungen in das Zellinnere und führen zum osmotischen Schock der Zelle (Lovelock 1954a).

Eine andere Erklärung gibt Leibo (1977). Beim Auftauen ist das Zellinnere nach starker Dehydratation hohen Elektrolytlösungen ausgesetzt, die Folge ist ein starker Wasserfluß von außen

in Richtung Zellinneres um die hohen Konzentrationen zu verdünnen. Die Zelle kann dem heftigen Einstrom nicht standhalten und platzt.

Ein weiterer Punkt der zu beachten ist, ist die Kultivierung der Zellen nach dem Einfrieren und Auftauen, um ihnen die Möglichkeit der Erholung und Anpassung zu geben. Es konnte nachgewiesen werden, daß eingefrorene und wieder aufgetaute Mäuseembryonen nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden eine Zellteilung hinter einem Kollektiv nicht behandelter Embryonen zurück waren. Diese Entwicklungsverzögerung wurde jedoch nach einer weiteren Kultivierung von 24 Stunden wieder aufgeholt (Whittingham 1977a).

I.2. Variable Faktoren beim Tiefgefrieren

Aus den oben beschriebenen grundsätzlichen Erwägungen beim Tiefgefrieren kann man schon ersehen, daß es viele Faktoren gibt, die beachtet werden müssen, um optimale, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

So spielen die Gefriereschwindigkeiten, die Auftaugeschwindigkeiten, die Wahl des Gefrierschutzmittels, die Temperatur, bei der das direkte Umsetzen in flüssigen Stickstoff erfolgt, das Medium zur Kultur der Zellen und schließlich auch mechanische Irritationen bei der technischen Handhabung eine große Rolle.

Sherman fand 1958 das langsame Einfrieren mit Geschwindigkeiten von $0,7^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ von Vorteil gegenüber dem schnelleren Einfrieren mit Geschwindigkeiten von $12^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$. Beim langsamen Einfrieren kommt es zur Dehydratation des Zellinneren und zur extrazellulären Eisbildung, die die intrazelluläre Eisbildung verhindert oder minimiert (Sherman und Teh Ping Lin 1958, Mazur 1963).

Eine Geschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ verhindert die Kristallbildung in fast allen Zellen, außer bei sehr großen (Mazur 1963). Die Gefahr hierbei besteht jedoch in der Konzentrierung der Lösungen und somit einer Erhöhung der Elektrolyte, die auf Grund des osmotischen Druckes eine Zellschädigung bewirken können (Mazur 1963, 1970, Lovelock 1954a).

Das schnelle Einfrieren verhindert die Dehydratation und .

führt so über die interne Eiskristallisation zur Zerstörung des Zytoplasmas (Sherman und Teh Ping Lin 1958).

In der Literatur werden die optimalen durchschnittlichen Gefriereschwindigkeiten zwischen $0,2^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ und $0,33^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ (Whittingham, Leibo und Mazur 1972; Wilmut 1972; Schneider, Hahn und Sulzer 1974; Leibo 1977; Parkening und Chang 1977) angegeben. Bei einigen Autoren finden sich sogar Einfriereschwindigkeiten von $1^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ bis zu $2^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ mit guten Ergebnissen (Whittingham, Leibo und Mazur 1972; Whittingham 1975). Parkening und Chang (1977) differenzieren das Geschwindigkeitsspektrum noch weiter, indem sie im Bereich bis -45°C ein Geschwindigkeitsoptimum von $0,35^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ finden und darunter bis -75°C mit einer Geschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ erfolgreich sind.

Von Bedeutung im Bezug auf die spätere Auftaugeschwindigkeit ist der Umsetzpunkt, d.h. die Temperatur bei der die Zellen direkt in flüssigen Stickstoff umgesetzt werden und ihre endgültige Temperatur von -196°C erreichen.

Bei den meisten Autoren finden sich hohe Umsetztemperaturen, d.h. Temperaturen von -74°C (Schneider, Hahn und Sulzer 1974),

von -70°C (Wilmut 1972) oder von -79°C (Miyamoto und Ishibashi 1981). Whittingham (1972) fand in seiner ersten Arbeit sogar, daß Temperaturen von -110°C besser seien, als eine Umsetztemperatur von -80°C . 1978 fand Whittingham jedoch sehr gute Ergebnisse für Umsetztemperaturen von -30°C bis -40°C .

Abhängig von der Umsetztemperatur ist die Wahl der Auf-
taugeschwindigkeit. Die Angaben in der Literatur zu diesem
Thema sind allerdings recht widersprüchlich. So stellten
z.B. Whittingham et al. 1979 die Maxime auf, daß schnelles
Auftauen mit Geschwindigkeiten von $275-500^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ nur möglich
sei, wenn die Umsetztemperatur im Bereich von -10°C bis -50°C
läge. Liegt die Umsetztemperatur bei -60°C und darunter ist
langsames Auftauen erforderlich mit Geschwindigkeiten von
 $8-20^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ Diese These wurde auch durch frühere Arbeiten
von Whittingham et al. untermauert (Whittingham, Leibo und
Mazur 1972; Whittingham 1975).

Die Mehrzahl der anderen Autoren beschreibt allerdings eine
schnelle Auftaugeschwindigkeit von durchschnittlich
 $360^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ als vorteilhaft (Wilmut 1972; Kasai, Niwa und

Iritani 1980; Miyamoto und Ishibashi 1981) unabhängig davon welche Umsetztemperatur vorher eingehalten wurde. Schneider Hahn und Sulzer (1974) finden schließlich überhaupt keinen Unterschied zwischen langsamen Auftaueschwindigkeiten von $5-15^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ und schnellen Auftaueschwindigkeiten von $360^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ nach einem Umsetzen der Zellen in flüssigen Stickstoff bei einer Temperatur von -74°C.

Die Wahl des Gefrierschutzmittels spielt eine wichtige Rolle bei der erfolgreichen Protektion der Zellen beim Einfrieren und Auftauen. Das Glyzerin als Kryoprotektivum wurde 1949 von Polge, Smith und Parkes entdeckt und von Sherman (1963) näher untersucht.

Gibt man Zellen in eine Glyzerinlösung, schrumpfen sie sehr schnell. Bei Temperaturen um 5°C bleiben die Zellen geschrumpft und es erfolgt kein Eindringen des Glyzerins in den Intrazellulärraum. Bei 37°C jedoch reexpandieren die Zellen und Glyzerin dringt innerhalb von 8-10 Minuten in das Zellinnere ein. Diese Zellen zeigen nach dem Einfrieren und Auftauen stärkere Strukturveränderungen, wie z.B. zunehmende dichte

Granulation und Ruptur der Zellmembran. Das volle Eindringen des Glycerins in den Intrazellulärraum bietet also keinen Schutz und der wirkungsvolle Angriffspunkt des Glycerins muß im Extrazellulärraum gesucht werden. Sherman konnte die Wirkung des Glycerins als Gefrierschutzmittel bei langsamem und schnellem Einfrieren aufdecken. Das Prinzip beruht beidesmal auf der Dehydratation. Beim langsamen Einfrieren ($0,7^{\circ}\text{C} - -0,9^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$) von Eizellen in Anwesenheit von 5% - 10% Glycerinlösung konnte eine morphologische Unversehrtheit von 90% festgestellt werden. Initial steht hier die langsame Dehydratation durch Osmose auf Grund der extrazellulären Glycerinkonzentration. Während des langsamen Einfrierens kommt es zur weiteren Dehydratation und somit zur Inhibition der internen Eiskristallisation. Das Glycerin wirkt hierbei als Gefrierschutzmittel durch die Erniedrigung des Gefrierpunktes. Dies funktioniert aber nur bis zu Temperaturen von -20°C . Erhöht man nun die Glycerinkonzentration auf 20-35%, so erreicht man eine rasche Dehydratation und folglich extrem geschrumpfte Zellen, die nach schnellem Einfrieren bis -196°C und anschließendem Auftauen keine sichtbaren morphologischen Ver-

Änderungen aufweisen (Sherman 1963).

Burks et al. konnten dies 1965 bestätigen, indem sie 100% intakte menschliche Eizellen nur bei 35% Glyzerin und einer Temperatur von 5°C erhielt.

Als Lovelock und Bishop 1959 das DMSO (Dimethylsulfoxyd) als Gefrierschutzmittel einsetzten, war ein weiterer Schritt auf dem Weg zur erfolgreichen Kryokonservierung getan.

Im Gegensatz zum Glyzerin wirkt das DMSO intrazellulär.

Leibo untersuchte 1977 die Wirkungsweise des DMSO näher.

Bei einer Temperatur von 0°C setzte er Embryonen im 8-Zell Stadium von einer isotonische Kochsalzlösung in eine hyper-tonische DMSO-Lösung um. Zuerst schrumpften die Zellen durch den osmotischen Wasserverlust, gleichzeitig drang aber DMSO in das Zellinnere ein und führte zur Äquilibration wieder Wasser mit, wodurch eine deutliche Zunahme des Zellvolumens zu verzeichnen war. Über einen längeren Zeitraum (90 Minuten) verbleibt die Zelle in diesem Zustand. Wird sie nun wieder in isotonische Kochsalzlösung zurückgegeben, kehrt sie zu ihrem ursprünglichen Volumen zurück. Anschließend an diese Behandlung konnte die weitere normale Entwicklung der Zellen

beobachtet werden.

Untersucht man nun die Volumenveränderung der Zelle nach DMSO-Beigabe in ihrem Verhalten bezüglich der Einfriereschwindigkeit so ergibt sich folgendes Bild: bei schneller Geschwindigkeit ändert sich das Zellvolumen wenig, bei langsamer Geschwindigkeit muß eine starke Volumenänderung registriert werden (Leibo 1977).

Die optimale Konzentration der DMSO wird mit 1,25 Mol (Whittingham, Leibo und Mazur 1972) bzw. 1,5 Mol (Wilmut 1972; Whittingham 1975; Whittingham et al. 1979; Kasai, Niwa und Iritani 1980) oder sogar mit 2,0 Mol (Schneider, Hahn und Sulzer 1974; Kasai, Niwa und Iritani 1980) angegeben.

Unterschiedlich stellt sich die Technik der Handhabung des Kryoprotektivums bei den einzelnen Autoren dar. So wird das Gefrierschutzmittel entweder bei 0°C (Whittingham, Leibo und Mazur 1972; Whittingham 1975; Whittingham et al. 1979; Schneider, Hahn und Sulzer 1974; Miyamoto und Ishibashi 1981) oder bei Zimmertemperatur (Whittingham et al. 1979) den Embryonen beigefügt. Dies geschieht durch direkte Inkubation der Zellen mit dem Kryoprotektivum (Whittingham, Leibo und

Mazur 1972) oder besser durch zweimalige (Miyamoto und Ishibashi 1981) oder dreimalige (Whittingham et al. 1979) fraktionierte Beigabe im Abstand von 10 bzw. 5 Minuten zur besseren Äquilibrierung.

Wichtig für das Überleben der Zellen ist es, nach dem Auftauen die Embryonen vom Gefrierschutzmittel wieder zu trennen. Whittingham et al. fanden keinen Unterschied zwischen dem schnellen Auswaschen der DMSO, d.h. der einmaligen Zugabe von 0,8 ml 10% PBS-Lösung (Dulbecco's phosphate-buffered salt solution) zu den aufgetauten Embryonen und der fraktionierten Zugabe von zweimal 0,2 ml und einmal 0,4 ml 10% PBS nach dem Auftauen (Whittingham et al. 1979).

Kasai, Niwa und Iritani (1980) hingegen fanden es von absoluter Wichtigkeit für das Überleben, das Gefrierschutzmittel langsam von den Embryonen zu trennen mittels der fraktionierten Zugabe von zweimal 0,2 ml und einmal 0,4 ml PBS im Abstand von 1 Minute.

In der vorliegenden Arbeit soll nun versucht werden die Parameter Gefrierschutzmittel, Gefrierschutzmittelkonzentration, Einfrier- und Auftaumethoden so zu verknüpfen, daß ein sicheres, reproduzierbares Ergebnis der Kryokonservierung von Eizellen möglich wird.

II. MATERIAL UND METHODE

II.1. TIERMATERIAL

Es wurden 6-8 Wochen alte weibliche Mäuse der Stämme NMRI/Hannover als Embryonenspender verwendet.

Für den Embryotransfer wurden Empfängermäuse des gleichen Stammes benutzt, bei denen durch Paarung mit vasktomierten Böcken eine Pseudoträchtigkeit induziert wurde.

Das Vasktomieren der Böcke erfolgte durch Abbinden und Excidieren beider Samenleiter in Narkose und anschließender Kontrolle der Sterilität mit normalen Weibchen über eine Woche.

II.2. EMBRYONENGEWINNUNG UND EMBRYONENBEARBEITUNG

II.2.1. Nährmedium

Als Medium zur Kultivierung der Embryonen diente Dulbecco's PBS (Fa. Serva, Heidelberg) mit einem Zusatz von hitze-

inaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS). Die PBS-Stammlösung wurde wie folgt angesetzt: Die beiden Lösungen A und B wurden in je 300 ml destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert und dann gemischt; anschließend wurde mit aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Es wurden nun 1 gr. D+ Glucose-Monohydrat, 36 mg Pyruvat, 20 mg Penicillin und 40 mg Streptomycin hinzugefügt. Die PBS-Stammlösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt und vor jeder Benutzung durchfiltriert. Für die 20 % PBS-Lösung wurde zu 80 ml Stammlösung 20 ml denaturiertes fetales Kälberserum gegeben, für die 10 % PBS-Lösung wurden entsprechend 90 ml Stammlösung und 10 ml denaturiertes Kälberserum gemischt.

II.2.2. Superovulation

Um reichlich Embryonen zu erhalten wurden die Mäuse superovuliert. Die Weibchen erhielten 5-10 IE PMSG (Seragon, Fa. Ferring GmbH, Kiel) intraperitoneal gespritzt. Nach 48 Stunden wurden 5-10 IE HCG (Primogonyl, Fa. Schering AG, Berlin/Bergkamen) gegeben.

Anschließend wurden die so superovulierten Weibchen für eine Nacht mit fertilen Böcken gepaart. Der Schleimpfropf in der Vagina am anderen Morgen zeigte die vollzogene Kopulation an. Dieser Tag wurde als erster Trächtigkeitstag definiert.

II.2.3. Gewinnung der Embryonen

Am 4. Trächtigkeitstag wurden die Embryonenspender mit Äther betäubt und durch cervikale Dislokation getötet. Nach Eröffnung der Bauchhöhle, Freipräparation und Säuberung der beiden Uterushörner wurden diese an der Vagina abgetrennt und anschließend in Petrischälchen mit 20% PBS-Lösung gelegt. Mit einer stumpfen Kanüle wurden dann die Uteri von der Hornspitze aus mit ca. 0,2 ml 20% PBS-Lösung durchgespült und die Embryonen in Uhrglasschälchen aufgefangen. Unter dem Stereomikroskop wurden die zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Morulae und Blastocysten gezählt, auf ihre morphologische Unversehrtheit hin geprüft und anschließend für einige Zeit im Brutschrank bei 37°C belassen, um ihnen die Möglichkeit zur Anpassung an die in vitro Bedingungen zu geben.

II.2.4. Beurteilungskriterien vor und nach der Kryokonservierung

Als erstes wurden die Zellen ihrer Entwicklungsstadien entsprechend ausgewählt, es kamen entweder Morulae oder Blastocysten in Frage. Abb.1 zeigt eine Morula, Abb.2 eine gerade beginnende und eine etwas ältere Blastocyste.

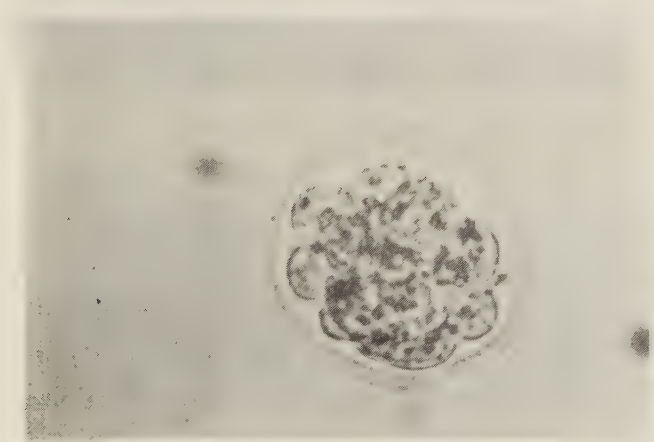


Abb.1: Morula vor dem Übergang zur Blastocyste

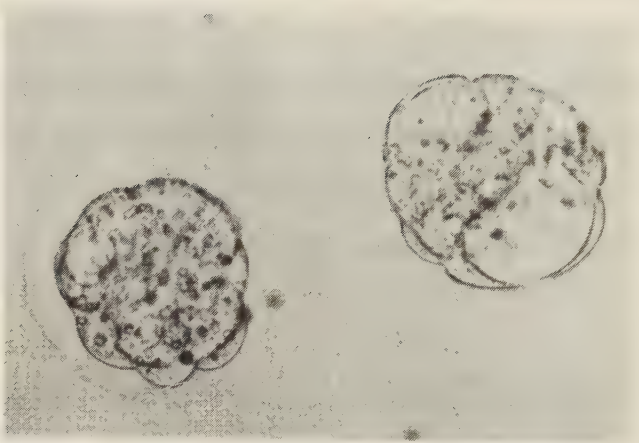


Abb.2: Links: gerade beginnende Blastocyste
Rechts: junge Blastocyste

Die Intaktheit der Zona pellucida (Abb.3) und die vollständige Anzahl der Teilungssegmente wurden begutachtet. Nach der Kryokonservierung wurde vorallem noch auf das Maß der Expansion und eventuell vorhandene Granulationen geachtet. (Abb.4)

Zum Transfer gelangten nur Zellen, die sich nach 2-3ständiger Kultur im Brutschrank weiterentwickelt hatten, was z.B. an der vollständigen Reexpansion oder auch im Übergang von der Morula zur Blastocyste erkennbar war.

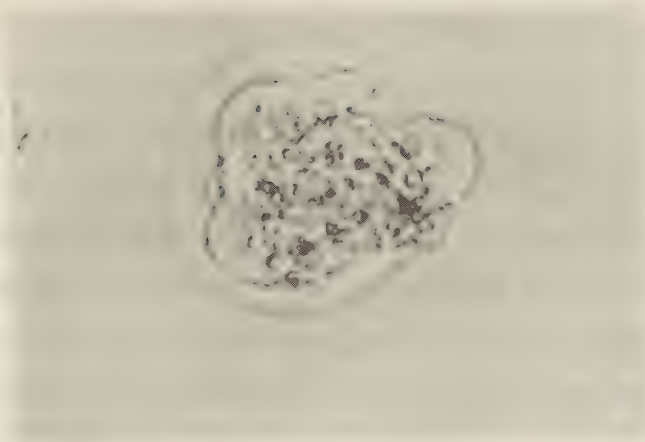


Abb.3: Morula mit Schaden an der Zona pellucida und Granulationen

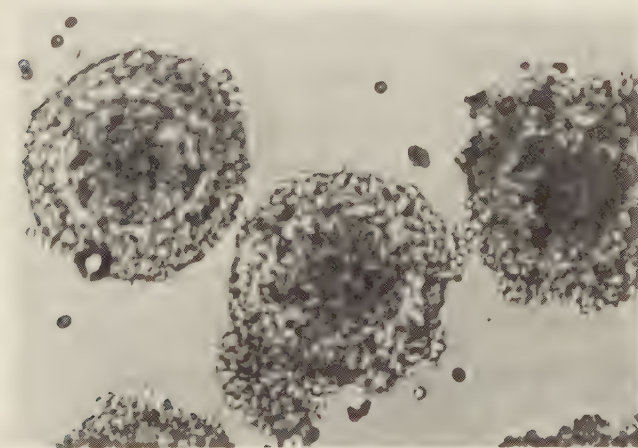


Abb.4: Sehr starke Granulationen, Degenerationshaufen

II.3. TECHNISCHES MATERIAL

II.3.1. Gefriergutbehälter

Als Gefriergutbehälter wurden handelsübliche transparente "Minitüb" (Fa. Abfülltechnik GmbH, Landshut/Bay.) verwendet, das sind Plastikröhrchen mit einer Länge von 50mm und einem Durchmesser von 4mm. Nach der Vermischung mit dem Kryoprotektivum wurden die Embryonen in die Minitübs gepackt und die Enden mit Metall und Glaskugeln verschlossen.

II.3.2. Einfriergerät

Abb.5 zeigt die schematische Gesamtanordnung des Gefriergerätes, das aus folgenden Teilen zusammengesetzt ist:

1. Die Hebevorrichtung für den Kühlmittelbehälter wird über einen Präzisionsspindelantrieb bewegt. Die Spindel wird von einem Gleichstromgetriebemotor angetrieben.
2. Ein Styroporbehälter dient als eigentliche Kühlvorrichtung, indem etwa 1l flüssiger Stickstoff eingefüllt wird.

3. Ein Kupferdrahtkörbchen trägt das Gefriergut, den Platinwiderstand (Meßfühler PT-100) und ein Kupferkonstantan-Thermoelement innerhalb eines mit Medium gefüllten Minütübs. Mit Hilfe einer galgenartigen Vorrichtung steht das Körbchen lotrecht über der Oberfläche des flüssigen Stickstoffes.

Zum Kühlen wird der Styroporbehälter mit dem flüssigen Stickstoff und der darüber befindlichen Stickstoffdampfphase in Richtung Gefriergut gehoben.

4. Steuergerät: Programmierbarer Temperaturregler, Typ:

PTC-200 (Fa. Planer, Sunbury-on-Thames, MIDDLESEX, England).

Abb.6 gibt die komplette Geräteanordnung einschließlich Schreiber für das Thermoelement wieder.

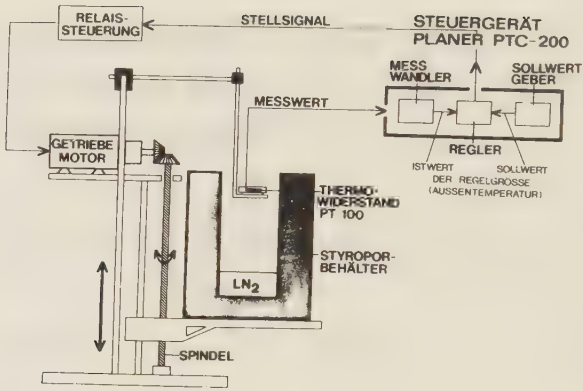


Abb.5: Schema des automatisierten "Offenen Einfriersystem"

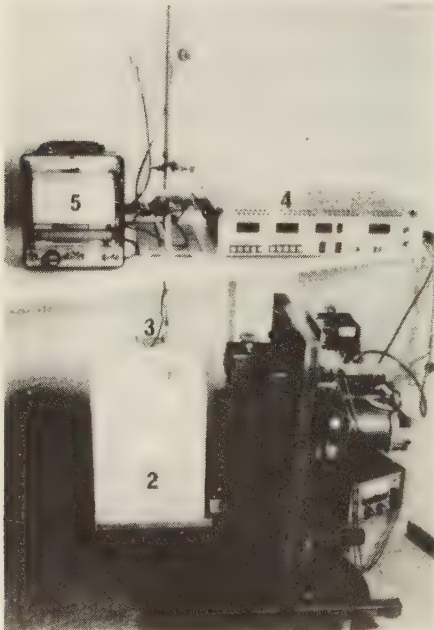


Abb.6: Komplette Geräte-anordnung;

- 1 Hebevorrichtung
- 2 Styroporbehälter
- 3 Galgen mit Kupferdrahtkörbchen
- 4 programmierbarer Temperaturregler Typ: PTC-200 der Fa. Planer England
- 5 Temperaturschreiber

II.4. KRYOPROTEKTIVUM

Als Kryoprotektivum wurden DMSO (Dimethylsulfoxid) und Glycerin verwendet. Beide Gefrierschutzmittel wurden hinsichtlich ihrer Konzentration, ihres Zugabemodus und ihres Auswaschmodus variiert. Das DMSO wurde in Konzentrationen von 1,25 molar und 1,5 molar verwendet. Die 1,25 molare DMSO-Lösung konnte durch Zugabe von 0,891 ml DMSO zu 10 ml der PBS-Stammlösung hergestellt werden, die 1,5 molare Lösung durch Zugabe von 1,066 ml DMSO zu 10 ml PBS-Stammlösung.

Beim Kryoprotektivum Glycerin kamen 0,5 molare und 1 molare Lösungen zur Anwendung. Wir gaben zu 10 ml der PBS-Stammlösung 0,75 ml bzw. 0,375 ml Glycerin.

Die Vermischung des Kryoprotektivums mit den Embryonen wurde auf verschiedene Art und Weise gehandhabt. Die DMSO-Lösung wurde zum einen bei Zimmertemperatur direkt in die Pailletten gefüllt, dazu wurden dann nur noch die Embryonen pipettiert. Zum anderen wurden die Embryonen erst in drei verschiedenen DMSO-Lösungen inkubiert, bevor sie in die Minitübs gefüllt wurden. Es wurden 3 Uhrglasschälchen mit Lösungen von 0,5 molarer, 1 molarer und 1,25 molarer DMSO

vorbereitet. Die Embryonen wurden nun durch die aufsteigenden Konzentrationen geschleust, wo sie jeweils 10 Minuten verblieben. Bei der Endmolarität von 1,25 wurde eine Äquilibrierungszeit von 30 Minuten eingehalten, bevor der Gefriervorgang gestartet wurde.

Mit dem Kryoprotektivum Glycerin wurde folgendermaßen verfahren: die 1 molare Glycerinlösung wurde in einer Menge von 0,2 ml direkt in die Pailletten pipettiert und anschließend mit den Embryonen vermischt. Im Falle der 0,5 molaren Glycerinlösung wurde zuerst 0,1ml 10% PBS-Lösung und die Embryonen pipettiert, dazu geben wir im Abstand von 5 Minuten noch zweimal 0,05 ml einer 1 molaren Glycerinlösung, sodaß eine Endmolarität von 0,5 des Glycerins erzielt wurde.

Bezüglich des Auswaschens des Kryoprotektivums nach dem Einfrier-Auftauvorgang wurden verschiedene Techniken angewandt. Zum einen wurde die Konzentration des Kryoprotektivums kontinuierlich verringert durch Zugabe von 10% PBS-Lösung. Es wurden im Abstand von 1 Minute nacheinander zweimal 0,1 ml 0,2 ml, 0,4 ml und 0,8 ml 10% PBS-Lösung zum Versuchsansatz gegeben, oder im Abstand von 30 Sekunden zweimal 0,2 ml und einmal 0,4 ml 10% PBS-Lösung den Embryonen beigelegt.

Zum anderen wurden die Embryonen in mehreren Schritten ausgeschleust. Dazu wurden 4 Uhrglasschälchen mit Konzentrationen von je 1,0 molarer, 0,75 molarer, 0,5 molarer und 0,25 molarer DMSO-Lösung vorbereitet. Die Embryonen wurden nun in absteigender Reihe durch diese Konzentrationen im Abstand von jeweils 5 Minuten geführt.

Anschließend an alle Auswaschtechniken wurden die Embryonen noch zweimal in 10% PBS-Lösung gewaschen und schließlich in 20% PBS-Lösung für einige Stunden im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

II.5. TECHNIK DES EINFRIERENS

II.5.1. Ermittlung der individuellen Seedingtemperatur

Vor dem eigentlichen Einfrieren wurde jeweils der Gefrierpunkt des Mediums ermittelt. Dazu wurde ein Probefinfriergang mit einer mit Medium gefüllten Minitüb bis zur Auslösung des Seedings, sichtbar am Temperatursprung, durchgeführt. Der höchste Punkt des Temperatursprunges ergibt

dann die Temperatur, bei der das Seeding mittels einer in flüssigem Stickstoff gekühlten Pinzette optimal ausgelöst wird.

II.5.2. Programmierung des Einfriergerätes

Von Zimmertemperatur bis 0°C wird mit einer Geschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ eingefroren. Von 0°C bis zur vorher ermittelten Seedingtemperatur wird eine Geschwindigkeit von $0,3^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ programmiert. Nach dem mit der gekühlten Pinzette ausgelösten Seeding wird für 5 Minuten äquilibriert, bei gleichbleibender Temperatur, um anschließend mit einer Geschwindigkeit von $0,3^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ bis zur endgültigen Umsetztemperatur fortzufahren. Die Temperaturen, bei denen der langsame, programmierte Einfriervorgang gestoppt wurde und die Pailletten mit den Embryonen direkt in flüssigen Stickstoff umgesetzt wurden, wurden variiert. Diese Umsetztemperaturen lagen bei -30°C , -35°C , $-37,5^{\circ}\text{C}$ oder -80°C .

II.6. TECHNIK DES AUFTAUENS

Es wurden 3 verschiedene Methoden des Auftauens erprobt.

Bei Methode 1 wurden die Pailletten dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei Zimmertemperatur abgewartet, bis sich ihr Inhalt wieder verflüssigt hatte.

Bei der zweiten Methode wurden die Pailletten aus dem flüssigen Stickstoff ins Wasserbad gelegt bei Temperaturen von $+15^{\circ}\text{C}$, $+20^{\circ}\text{C}$ oder $+40^{\circ}\text{C}$.

Die dritte Methode des Auftauens erfolgte mit Hilfe des Einfriergerätes computergesteuert mit sehr langsamen Geschwindigkeiten. Das Einfriergerät wurde hierzu folgendermaßen programmiert: Von -70°C bis -50°C wurde eine Geschwindigkeit von $4^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ eingegeben. Von -50°C bis 0°C wurde die Geschwindigkeit auf $2^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ reduziert. Dazu wurden die Pailletten nun aus dem flüssigen Stickstoff direkt auf den Gitterrost des Einfriergerätes, entsprechend einer Temperatur von -70°C , gebracht und der computergesteuerte Auftauvorgang wurde gestartet.

Diese letzte Methode fand Anwendung bei Embryonen die bis zur Umsetztemperatur von -80°C langsam per Computer eingefroren

wurden, gemäß der Thesen von Whittingham et al. (1979) wonach langsames Einfrieren bis -80°C auch langsames Auftauen erfordert.

Anschließend an alle verschiedenen Auftauvorgänge wurden die Enden der aufgetauten Pailletten vorsichtig mit der Schere aufgeschnitten und die Embryonen in Uhrglasschälchen aufgefangen. Nun erfolgte die Zählung und erste morphologische Beurteilung der Embryonen nach den bereits oben erwähnten Kriterien und ihre Kultivierung im Brutschrank für zwei bis drei Stunden.

II.7. EMBRYOTRANSFER

II.7.1. Instrumente

Für den Transfer wurden folgende Instrumente verwendet:

2 anatomische Pinzetten, 2 chirurgische Pinzetten, 1 Schere
1 Kanüle Nr. 23, 1 Kanüle Nr. 16, 1 Einmalspritze 2 ml mit
Kapillare, Nadelhalter und Catgut als Nahtmaterial.

II.7.2. Vorbereitung der Embryonen zum Transfer

Nach der 3stündigen Kultivierung im Brutschrank wurden die Embryonen nun ein letztes Mal nach den genannten Kriterien beurteilt und für den Transfer ausgewählt. Die Zellen wurden nun in Gruppen zu 5-10 Embryonen auf verschiedene Petrischalen verteilt, je nach dem wieviel Zellen in ein Uterushorn transferiert werden sollten. Unter dem Mikroskop wurden dann die Embryonen mit einer an einer Einmalspritze befestigten Kapillare aufgezo-gen, mittels der dann die Embryonen in den Uterus der Maus gespült werden konnten.

II.7.3. OP-Technik beim Transfer

Die minus 1 Tag asynchronen pseudoträchtigen Ammenmäuse wurden mit 0,15 ml Hypnodil intraperitoneal betäubt. Nach der Fixierung auf einer mit sterilem Tuch überzogenen Syroporplatte wurde die Bauchhaut und das Peritoneum mit einem Längsschnitt von 1,5-2 cm Länge eröffnet und ein Uterushorn sorgfältig frei-

präpariert. Das Uterushorn wurde nun mit einer anatomischen Pinzette unterfaßt und vorsichtig gestrafft. Mit der Kanüle Nr. 23 wurde zunächst das Horn angestochen und mit einer weiteren Kanüle Nr. 16 vorsichtig ins Lumen eingegangen. Mit der vorbereiteten Kapillare wurden nun die Embryonen durch das präformierte Loch ins Uteruslumen eingespült. Der Uterus verschließt sich durch Kontraktion selbst.

Mit dem zweiten Uterushorn wurde ebenso verfahren. Peritoneum und Haut wurden mit Catgutfäden genäht. Die Maus wurde in Papiertücher eingewickelt und der Wurf nach 21 Tagen abgewartet.

II.8. LAPAROTOMIE ZUR FESTSTELLUNG DER IMPLANTATIONEN

Bei einem Teil der Ammentiere wurde zur Feststellung der Implantationen und Resorptionen am 12. Tag der Trächtigkeit eine Kontroll-Laparotomie durchgeführt. Nach leichter Betäubung mit 0,15 ml Hypnodil streng intraperitoneal wurden die Bauchhaut

und das Peritoneum eröffnet. Die Uterushörner wurden sorgfältig freigelegt und die Implantationen bzw. Resorptionen gezählt. Nach Verschuß des Peritoneums und der Haut mittels Catgutnaht konnten die Mäuse ihre Schwangerschaft weiter austragen.

II.9. ÜBERPRÜFUNG DER NEUGEBORENEN MÄUSE

Die neugeborenen Mäuse waren makroskopisch unauffällig. Kopf, Extremitäten und Haut wichen durch nichts von der Norm ab. Durch die Fortpflanzungsmöglichkeit über 4 Generationen konnte eine normale Fertilität nachgewiesen werden. Auch sonst zeigten sich keinerlei Auffälligkeiten.



III. ERGEBNISSE

III.1. VERSUCHSGRUPPE I: KRYOPROTEKTIVUM DMSO

In der Versuchsgruppe I sollten Erkenntnisse über Einfrier-
verfahren mit dem Kryoprotektivum DMSO (Dimethylsulfoxid)
unter verschiedenen Konzentrationen, verschiedenen Einfrier-
temperaturen und Auftaumethoden gewonnen werden.

Versuch I/1

Das DMSO in einer Konzentration von 1,5 molar wurde den
Embryonen bei Zimmertemperatur in den Pailletten direkt zuge-
geben. Die Pailletten wurden bis zu einer Temperatur von -80°C
mit Hilfe des Einfriergerätes langsam eingefroren und dann in
flüssigen Stickstoff umgesetzt. Abb.7 gibt die Einfriergraphik
und die errechneten Durchschnittsgeschwindigkeiten wieder.

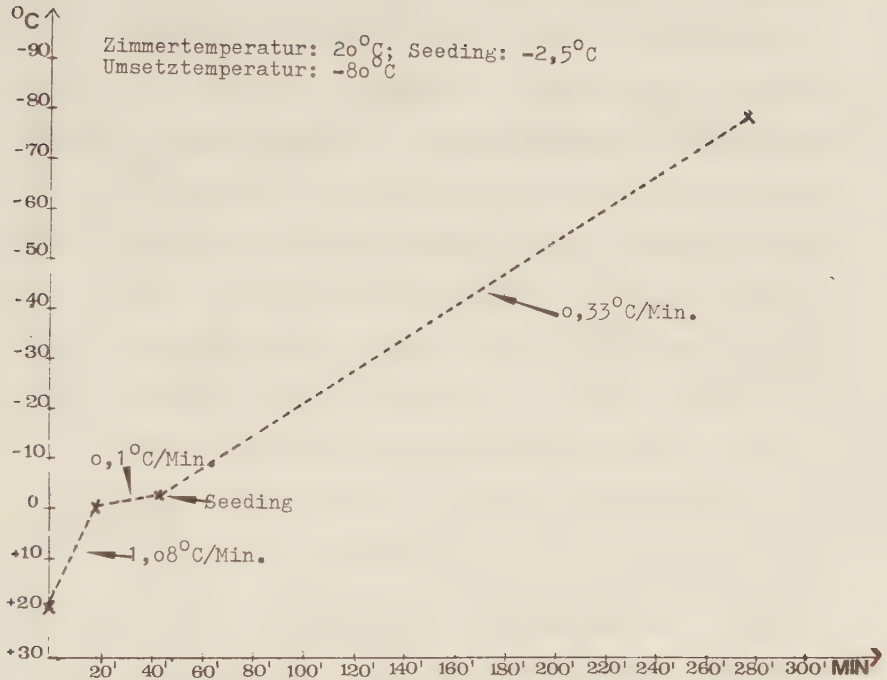


Abb. 7 :Einfriergraphik und Durchschnittsgeschwindigkeiten zu Versuch I/1

Das Auftauen erfolgte mit Hilfe eines Wasserbades von $+20^{\circ}\text{C}$.

Durch Zugabe von 0,2 ml, 0,2 ml und 0,4 ml 10% PBS-Lösung konnte das DMSO anschließend fraktioniert entfernt werden.

Von den 33 so behandelten Embryonen konnten 32 nach diesen

Manipulationen wiedergefunden und beurteilt werden. Die 16 morphologisch einwandfreien Morulae, also 50% der behandelten Zellen, wurden 2 Ammenmäusen transferiert. Bereits am 19. Tag der Trächtigkeit wurde ein Junges geboren, das jedoch von der Mutter nicht angenommen wurde. Da auch keine andere Ammenmutter zur Verfügung stand verstarb das Junge 7 Stunden später. Beide Transfermäuse wurden dann 2 Tage nach dem errechneten Entbindungstermin laparotomiert. Es fanden sich insgesamt 11 Implantations- bzw. Resorptionsstellen. Bezieht man nun die Implantationen und die Geburt auf die transferierten Embryonen ergibt sich eine Implantationsrate von 68,75% und eine Geburtenrate von 6,25%. Tabelle 1 und 2 geben das Ergebnis wieder.

Tabelle 1:

Überlebensraten der Embryonen nach Behandlung mit 1,5 molarer DMSO, Umsetztemperatur von -80°C , Auftauen im Wasserbad von $+20^{\circ}\text{C}$.

Anzahl der eingefrorenen Embryonen	Anzahl der nach dem Auftauen wiedergefundenen Embryonen	Anzahl morpholog. intakter Embryonen nach 3stündiger Kultur	
Nr.	Nr.	Nr.	%
33	32	16	50

Tabelle 2:

Implantations- und Geburtenrate der Embryonen nach Behandlung mit 1,5 molarer DMSO, Umsetztemperatur von -80°C und Auftauen im Wasserbad von $+20^{\circ}\text{C}$.

Anzahl der Embryonen für den Transfer	Anzahl der Empfänger-tiere	Anzahl der Implantationen		Anzahl der geborenen Jungen	
Nr.	Nr.	Nr.	%	Nr.	%
16	2	11	68,75	1	6,25

Versuch I/2:

Den insgesamt 67 Embryonen dieser Versuchsreihe wurde die 1,5 molare DMSO-Lösung durch einmalige Zugabe beigelegt. Nach einem langsamen Einfriervorgang (Abb. 8) und einer Umsetztemperatur von -80°C wurden die Zellen mit Hilfe des computergesteuerten Einfriergerätes wieder aufgetaut.

Von den 57 wiedergefundenen Embryonen waren nur 6 Morulae morphologisch beurteilbar, die anderen Zellen waren alle zerplatzt. Auch diese 6 Morulae wiesen leichte Granulationen auf, sodaß auf einen Transfer verzichtet wurde.

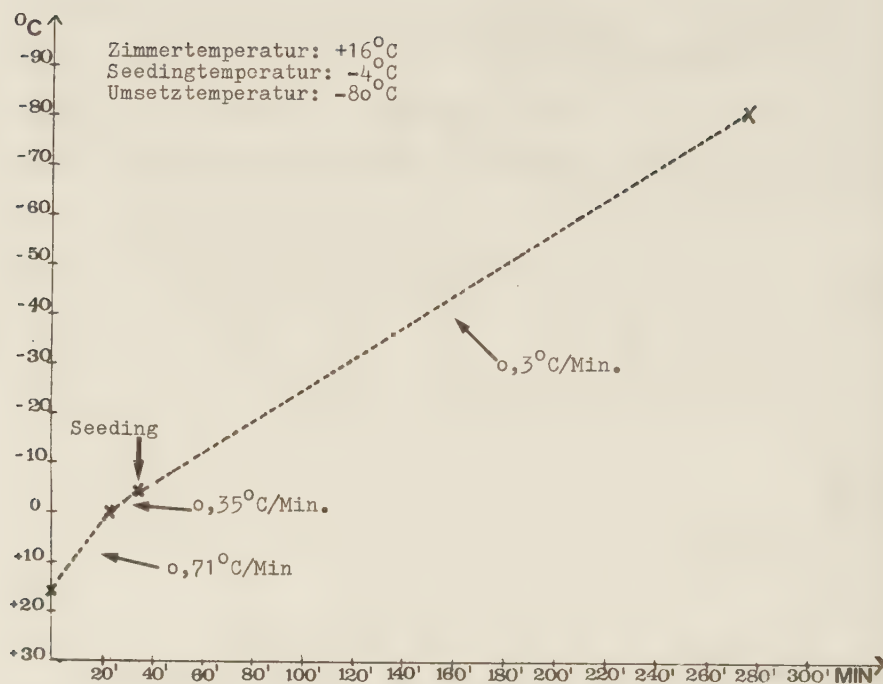


Abb. 8 : Einfriergraphik und Durchschnittsgeschwindigkeiten zu Versuch I/2

Versuch I/3:

Beim dritten Versuch dieser Gruppe wurde die DMSO-Konzentration auf 1,25 molar geändert. Die Zugabe erfolgte einmalig bei Zimmertemperatur, die Umsetztemperatur lag bei $-37,5^{\circ}\text{C}$.

Die Einfriergraphik mit den Durchschnittsgeschwindigkeiten zeigt Abb.9

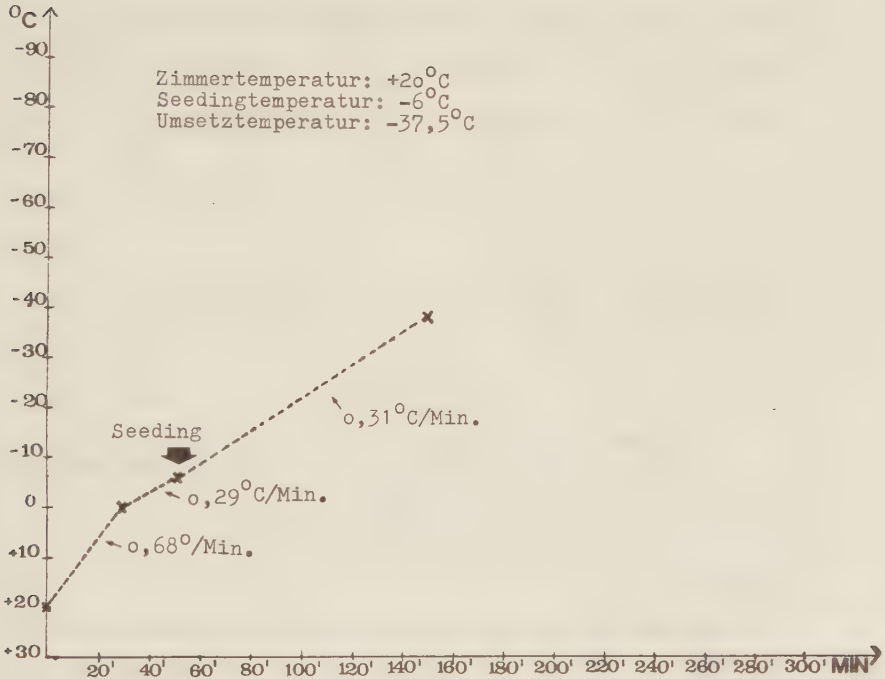


Abb.9 : Einfriergraphik und Durchschnittsgeschwindigkeiten zu Versuch I/3

Zum Auftauen diente ein $+40^{\circ}\text{C}$ warmes Wasserbad. Durch fraktionierte Zugabe von 0,2 ml, 0,2 ml und 0,4 ml der 10% PBS-Lösung wurde das Gefrierschutzmittel ausgedünnt. Von den

so behandelten 213 Embryonen konnten nur 154 wiedergefunden werden. Davon waren 50 Embryonen in morphologisch gutem Zustand, entsprechend 32,4%. Die 14 Blastocysten und 36 Morulae wurden 7 Mäusen eingepflanzt. Es kam zu insgesamt 6 Geburten, was einer Geburtenrate von 12% entspricht. Das Ergebnis wird in den Tabellen 3 und 4 zusammengefaßt.

Tabelle 3:
Überlebensraten der Embryonen nach Behandlung mit 1,25 molarer DMSO, Umsetztemperatur von $-37,5^{\circ}\text{C}$ und Auftauen im Wasserbad von $+40^{\circ}\text{C}$

	Anzahl der eingefrorenen Embryonen	Anzahl der nach dem Auftauen wiedergefundenen Embryonen	Anzahl morpholog. intakter Embryonen nach 3stündiger Kultur	
	Nr.	Nr.	Nr.	%
Blasto- cysten	119		14	
Morulae	92		36	
insges.	211	154	50	32,4

Tabelle 4:

Geburtenrate der Embryonen nach Behandlung mit 1,25 molarer DMSO, Umsetztemperatur von $-37,5^{\circ}\text{C}$ und Auftauen im Wasserbad von $+40^{\circ}\text{C}$

Anzahl der Embryonen für den Transfer	Anzahl der Empfänger-tiere	Anzahl der geborenen Jungen	
Nr.	Nr.	Nr.	%
50	7	6	12

Versuch I/4:

Die Embryonen wurden nach dreimaliger Inkubation in 0,5 molarer, 1,0 molarer und 1,25 molarer DMSO-Lösung mit einer Endkonzentration von 1,25 eingefroren. Bis -30°C wurde mit Hilfe des Computers eingefroren, anschließend wurde direkt in flüssigen Stickstoff umgesetzt. (Abb.10)

In einem Wasserbad von $+15^{\circ}\text{C}$ wurden die Embryonen dann wieder aufgetaut. Die Auswaschung des DMSO geschah durch fraktionierte Rückführung der Zellen in immer niedrigere DMSO-Konzentrationen und anschließender Waschung mit 10% PBS-Lösung.

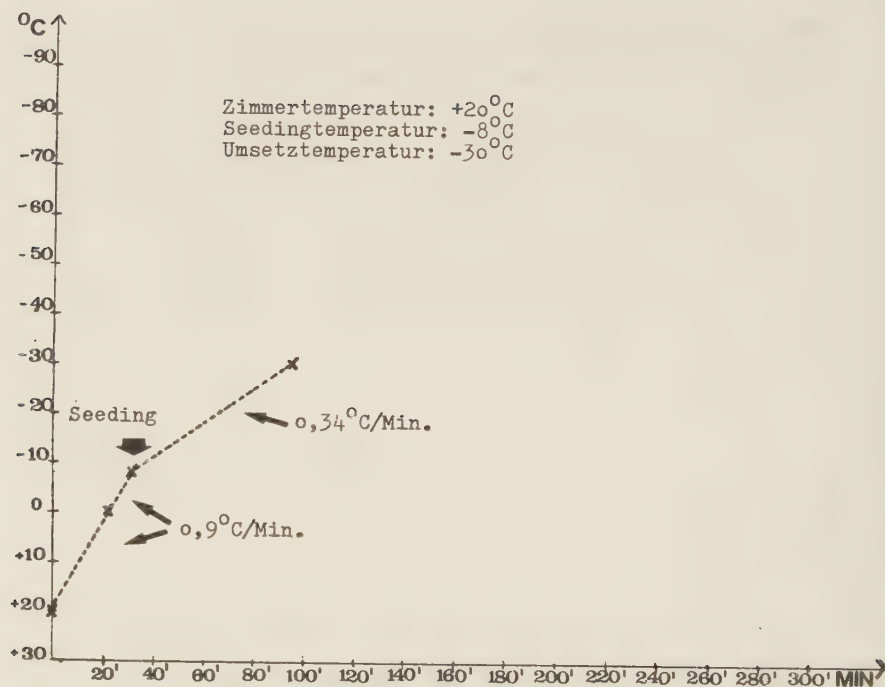


Abb. 10: Einfriergraphik und Durchschnittsgeschwindigkeiten zu Versuch I/4

Von den insgesamt 317 so behandelten Embryonen wurden 262 wiedergefunden und beurteilt. Nach 3stündiger Kultur waren noch 201 Embryonen, entsprechend 76,7% in einwandfreiem Zustand. Von 71 Blastocysten und 130 Morulae wurden 70 Blasto-

cysten und 107 Morulae zum Transfer ausgewählt.

14 Empfängertiere standen zur Verfügung. Es wurden insgesamt 23 Jungtiere geboren. Die Tabellen 5 und 6 geben die Ergebnisse wieder.

Tabelle 5:

Überlebensraten der Embryonen nach Behandlung mit 1,25 molarer DMSO, Umsetztemperatur von -30°C und Auftauen im Wasserbad von +15°C

	Anzahl der eingefrorenen Embryonen	Anzahl der nach dem Auftauen wiedergefundenen Embryonen	Anzahl morpholog. intakter Embryonen nach 3stündiger Kultur	
	Nr.	Nr.	Nr.	%
Blastocysten	108		71	
Morulae	209		130	
insges.	317	262	201	76,7

Tabelle 6:

Geburtenraten der Embryonen nach Behandlung mit 1,25 molarer DMSO, Umsetztemperatur von -30°C und Auftauen im Wasserbad von +15°C

Anzahl der Embryonen für den Transfer	Anzahl der Empfängertiere	Anzahl der geborenen Jungen	
Nr.	Nr.	Nr.	%
177	14	23	12,9

Ein Teilkollektiv dieser Versuchsreihe wurde am 12.Tag der Trächtigkeit laparotomiert, um die Implantationen bzw. Resorptionen festzustellen. Alle Tiere konnten ihre Schwangerschaft fortsetzen.

62 Embryonen wurden insgesamt 6 Empfängermäusen transferiert. Bei den Laparotomien konnten insgesamt 18 Feten und 10 Resorptionsstellen gezählt werden, dies entspricht einer Implantationsrate von 45,1%.

Von den 18 gezählten Feten wurden nach 21 Tagen 10 lebende Jungmäuse geboren. Tabelle 7 gibt eine Zusammenstellung dieser Ergebnisse.

Tabelle 7:

Implantations- und Geburtenrate der Embryonen nach Behandlung mit 1,25 molarer DMSO, Umsetzungstemperatur von -30°C und Auftauen im Wasserbad von $+15^{\circ}\text{C}$. Teilkollektiv aus Versuch I/4

Anzahl der Embryonen für den Transfer Nr.	Anzahl der Empfängertiere Nr.	Anzahl der Implantationen (Feten+Resorpt.)		Anzahl der geborenen Jungen	
		Nr.	%	Nr.	%
62	6	28	45,1	10	16,1

III.2. VERSUCHSGRUPPE II: KRYOPROTEKTIVUM GLYZERIN

In der zweiten Versuchsgruppe wurde mit dem Gefrierschutzmittel Glycerin experimentiert. Auch hier wurden Umsetztemperatur, Auftauvorgang, Konzentration, Zugabe und das Auswaschen des Kryoprotektivums variiert.

Versuch II/1:

Das Glycerin in einer Konzentration von 0,5 molar gaben wir in schon beschriebener Weise mit den Embryonen in die Gefriergutbehälter. Bis -35°C wurden die Embryonen nach dem vorher beschriebenen Verfahren eingefroren und danach direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Abb. 11 zeigt die Einfriergraphik und die errechneten Durchschnittsgeschwindigkeiten für diesen Versuch.

Zum Auftauen wurden die Pailletten in ein Wasserbad von $+40^{\circ}\text{C}$ gelegt, was einer Auftaugeschwindigkeit von ca. $460^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ entspricht.

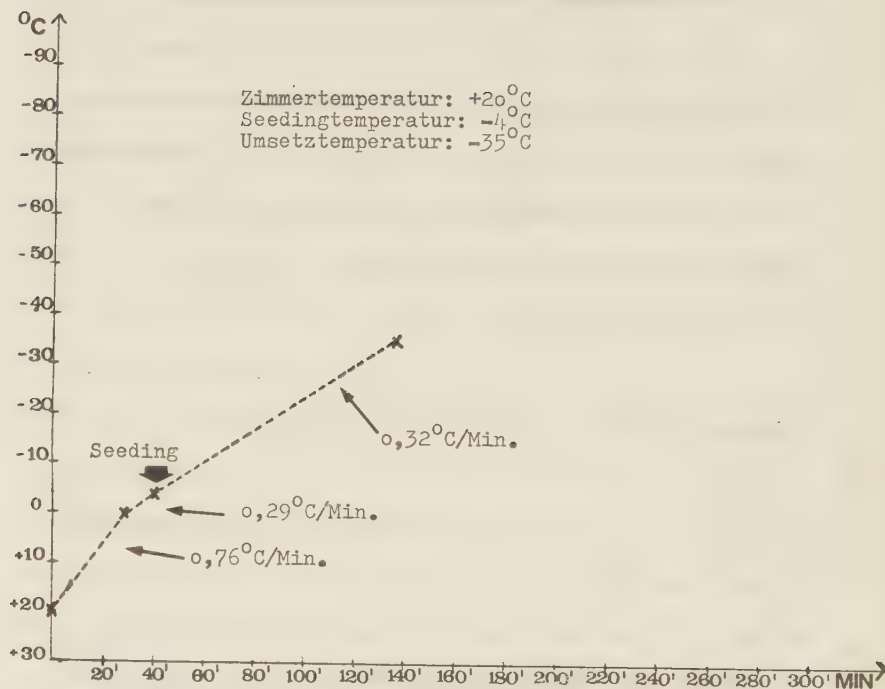


Abb. 11: Einfriergraphik und Durchschnittsgeschwindigkeiten für Versuch II/1

Das Auswaschen geschah durch 5malige fraktionierte Zugabe der 10% PBS-Lösung im Abstand von jeweils 1 Minute. Von den 68 eingefrorenen Zellen konnten 62 nach dem Auftauen unter dem Mikroskop befundet werden. Nach 3stündiger Kultur im Brutschrank waren 8 Morulae intakt. Alle anderen waren

entweder geplatzt oder mit sehr starken Granulationen behaftet. Die 8 Morulae wurden einer Ammenmaus eingepflanzt. Es kam jedoch zu keiner Geburt. Das Ergebnis wird in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8:

Überlebensraten der Embryonen nach Behandlung mit 0,5 molarem Glycerin, Umsetztemperatur von -35°C und Auftauen im Wasserbad von $+40^{\circ}\text{C}$

Anzahl der eingefrorenen Embryonen	Anzahl der nach dem Auftauen wiedergefundenen Embryonen	Anzahl morpholog. intakter Embryonen nach 3stündiger Kultur	
Nr.	Nr.	Nr.	%
68	62	8	12,9

Versuch II/2:

Glyzerinkonzentration und Zugabemodus wurden wie in Versuch II/1 gewählt. Die Umsetztemperatur lag jedoch bei -80°C . Abb. 12 zeigt die Graphik dieses Einfriervorganges.

Nach einer Lagerzeit von 2 Wochen wurden die Pailletten aus dem flüssigen Stickstoff genommen und bei Zimmertemperatur aufgetaut.

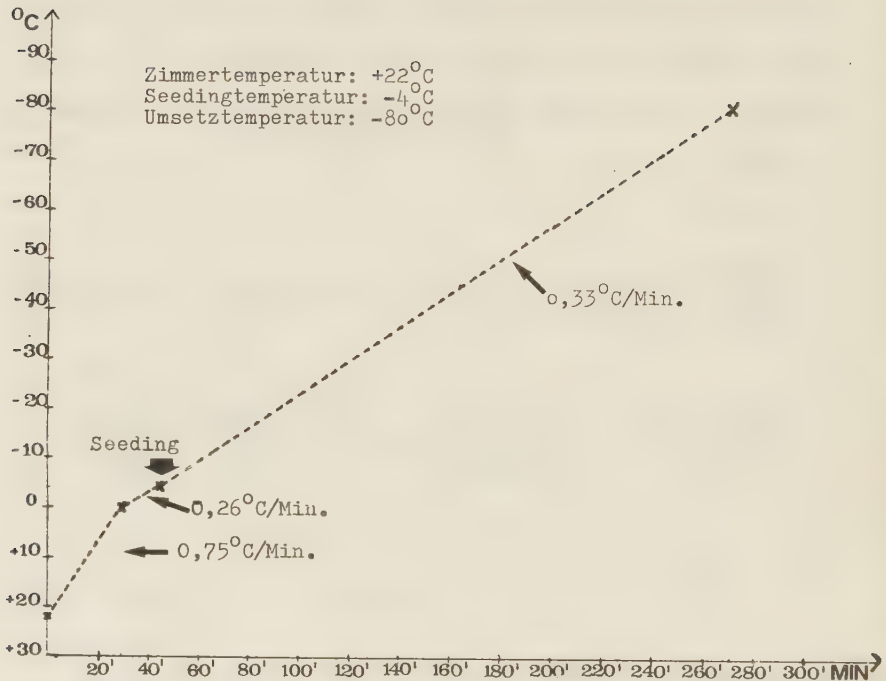


Abb. 12 Einfriergraphik und Durchschnittsgeschwindigkeiten für Versuch II/2

Die Entfernung des Glyzerins geschah wiederum durch 5malige fraktionierte Zugabe von 10% PBS-Lösung und anschließend zweimaligen Waschen in 10% PBS-Lösung.

Von den insgesamt 103 so behandelten Embryonen konnten nach dem Auftauen 88 unter dem Mikroskop gefunden werden.

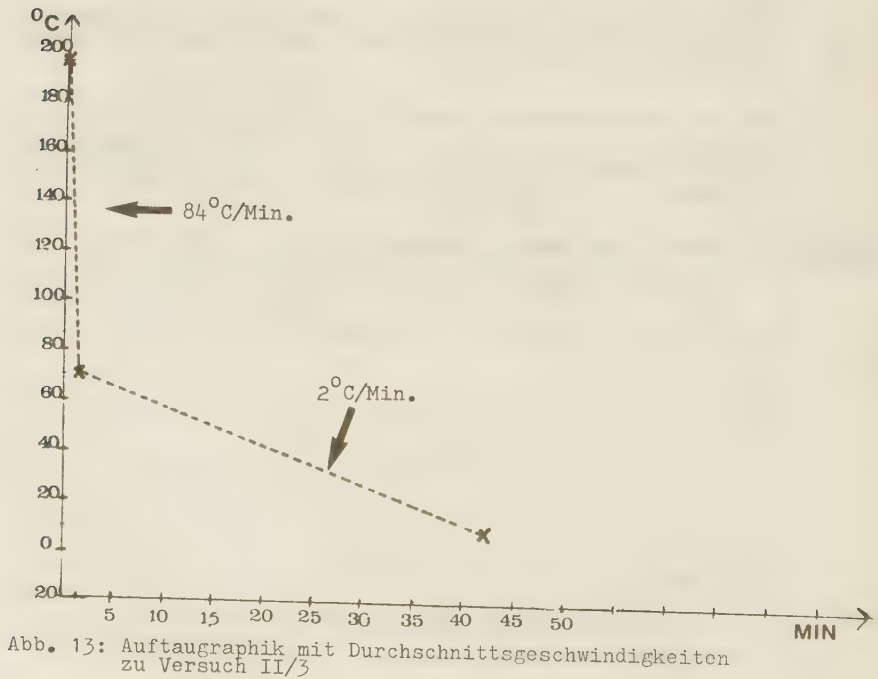
Auch hier zeigte sich sowohl vor als auch nach der 3stündigen Kultur im Brutschrank eine große Zahl beschädigter Embryonen, die zum Teil nur noch als große Degenerationshaufen zu erkennen waren. Nur 9 Morulae konnten als einwandfrei identifiziert werden. Auch hier verlief die Schwangerschaft der zum Transfer benutzten Maus negativ; es kam zu keiner Geburt. Tabelle 9 faßt das Ergebnis dieses Versuches zusammen.

Tabelle 9:
Überlebensraten der Embryonen nach Behandlung mit 0,5 molarem Glycerin, Umsetztemperatur von -80°C und Auftauen bei Zimmertemperatur

Anzahl der eingefrorenen Embryonen Nr.	Anzahl der nach dem Auftauen wiedergefundenen Embryonen Nr.	Anzahl morpholog. intakter Embryonen nach 3stündiger Kultur	
		Nr.	%
103	88	9	10,2

Versuch II/3:

Nach einer Behandlung mit 0,5 molarem Gylzerin und einer Umsetztemperatur von -80°C mit der gleichen Technik wie bei den zwei vorhergehenden Versuchen, wurde diesmal der Auftauvorgang per Computer gesteuert, d.h. mit wesentlich langsameren Auftaugeschwindigkeiten durchgeführt. Abb.13 zeigt die Graphik des Auftauvorganges per Computer bei diesem Versuch.



Das Auswaschen des Kryoprotektivums erfolgte wieder in 5 Schritten und zweimaligem Waschen in 10% PBS-Lösung.

Das Ergebnis dieses Versuches war jedoch enttäuschend, keine einzige der insgesamt 126 eingefrorenen Zellen konnte als morphologisch intakt beurteilt werden. Ein Großteil der Zellen war geplatzt, sodaß nur noch Degenerationshaufen zu sehen waren. Der andere Teil der Embryonen, die noch eine intakte Zona pellucida aufwiesen, zeigte derart starke Granulationen, daß auf den Versuch des Transfers verzichtet wurde.

Versuch II/4:

In diesem Versuch wurde mit einer 1 Mol Glycerinkonzentration gearbeitet, die durch eine einmalige Zugabe den Embryonen beigefügt wurde. Bei -35°C wurden die Pailletten in flüssigen Stickstoff umgesetzt. Das Auftauen geschah im Wasserbad von $+40^{\circ}\text{C}$ und das Entfernen des Glycerins durch fünfmalige fraktionierte Zugabe von 10% PBS-Lösung.

Von den eingefrorenen 169 Embryonen konnten lediglich 101 wiedergefunden werden. Davon waren sofort nach dem Auftauen

47 Embryonen in einwandfreiem Zustand. Von den 6 Blastocysten und 41 Morulae waren nach 3stündiger Kultur noch 3 Blastocysten und 36 Morulae morphologisch in Ordnung, was einer Überlebensrate von 38,6% entspricht. Die aufgeschlüsselten Ergebnisse sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10:

Überlebensraten der Embryonen nach Behandlung mit 1 molarem Glyzerin, Umsetztemperatur von -35°C und Auftauen im Wasserbad von $+40^{\circ}\text{C}$

	Anzahl der eingefrorenen Embryonen	Anzahl der nach dem Auftauen wiedergefundenen Embryonen	Anzahl morpholog. intakter Embryonen nach 3stündiger Kultur	
	Nr.	Nr.	Nr.	%
Blasto- cysten	53		3	
Morulae	116		36	
insges.	169	101	39	38,6

Die intakten Embryonen wurden nun auf 5 Mäuse transferiert. Es kam jedoch auch hier zu keiner vollständig ausgetragenen Schwangerschaft. In den ersten Trächtigkeitstagen konnte eine Zunahme des Leibesumfanges der Mäuse beobachtet werden.

Auch der Tastbefund ließ auf primäre Implantationen schließen. Nach spätestens 14 Tagen konnten jedoch keine Schwangerschaftszeichen mehr festgestellt werden, die Mäuse waren wieder "schlank" wie vor dem Transfer. Man muß hier eine vollständige Resorption annehmen. Auf eine explorative Laparotomie wurde verzichtet.

Versuch II/5:

Versuch 5 wurde wie Versuch II/4 bezüglich Technik und Kryoprotektivum von 1 molarem Glycerin durchgeführt. Das Umsetzen in flüssigen Stickstoff geschah jedoch erst bei -80°C und das Auftauen wurde computergesteuert mit niedrigen Auftaueschwindigkeiten.

Von den 100 so behandelten Embryonen konnten nach dem Auftauen 95 wiedergefunden werden. Die sofortige mikroskopische Begutachtung zeigte 45 Morulae, die sich zur Kultur eigneten, was einem Prozentsatz von 47,3 entspricht. Nach 3stündiger Kultur waren noch 35 Morulae, entsprechend 36,8%, intakt.

Die Embryonen wurden 3 Empfängerinnen eingeplant; es kam jedoch zu keiner Geburt. Die Schwangerschaften wurden wieder nur ungefähr bis zur Hälfte ausgetragen und dann wahrscheinlich resorbiert.

Das Gesamtergebnis diese Versuches gibt Tabelle 11 wieder.

Tabelle 11:
Überlebensraten der Embryonen nach Behandlung mit 1 molarer Glycerinlösung, Umsetztemperatur von -80°C und Auftauen mittels Computer

Anzahl der eingefrorenen Embryonen	Anzahl der nach dem Auftauen wiedergefundenen Embryonen	Anzahl morpholog. intakter Embryonen nach 3stündiger Kultur	
Nr.	Nr.	Nr.	%
100	95	35	36,8

IV. DISKUSSION

Betrachtet man nun die mit dem Kryoprotektivum **Glyzerin** durchgeführten Versuche, so stellte sich heraus, daß der 1 molaren Konzentration des Glyzerins deutlich der Vorzug zu geben ist gegenüber der Molarität von 0,5. Die Technik des Einfrierens und des Auftauens ist dabei weniger von Bedeutung. Ob der Einfriervorgang mit Hilfe des Computers bis -80°C oder bis -35°C abläuft bevor in flüssigen Stickstoff umgesetzt wird erschien relativ unerheblich. Auch die verschiedenen Auftauvorgänge, wie z.B. Wasserbad von $+40^{\circ}\text{C}$, Auftauen bei Zimmertemperatur oder mittels Computer spielen kaum eine Rolle. Tabelle 9 und 10 zeigen die Ergebnisse für 1 und 0,5 molares Glyzerin im Vergleich.

Tabelle 9:
Vergleich der Überlebensraten von Mäuseembryonen nach Behandlung mit 1 molarem Glyzerin bei verschiedenen Einfriermethoden

Umsetztemp. Auftaumeth.	Anzahl eingefror. Embryonen Nr.	Anzahl gefunden. Embryonen Nr.	Anzahl morph. intakter Embryonen		Anzahl der Geburten Nr.
			Nr.	%	
-80°C Comp.	100	95	35	36,8	0
-35°C $+40^{\circ}\text{C}$	169	101	39	38,6	0

Tabelle 10:

Vergleich der Überlebensraten von Mäuseembryonen nach Behandlung mit 0,5 molarem Glyzerin bei verschiedenen Einfriermethoden

Umsetztemp. Auftaumeth.	Anzahl eingefror. Embryonen Nr.	Anzahl ge funden. Embryonen Nr.	Anzahl morph. intakter Embryonen		Anzahl der Geburten Nr.
			Nr.	%	
-35°C +40°C	68	62	8	12,5	0
-80°C ZT	103	88	9	10,2	0
-80°C Comp.	126	100	0	0	0

Die Überlebensraten bei Whittingham, Leibo und Mazur (1972) von maximal 34% bei einer Glyzerinkonzentration von 1 molar und einer Gefriereschwindigkeit von 1,2°C/Min. decken sich mit den in den genannten eigenen Versuchen gefundenen Prozentzahlen von 36,8 für eine Umsetztemperatur von -80°C und 38,6 für eine Umsetztemperatur von -35°C.

Aufgrund dieses Resultates kann man annehmen, daß beim Kryoprotektivum Glyzerin eine Mindestkonzentration von 1 molar eingehalten werden muß um einen vollständigen und sicheren Gefrierschutz zu erreichen.

Die mit 0,5 molarem Glyzerin behandelten Zellen zeigten nach dem Auftauen deutliche Zeichen der Schädigung, die auf den anscheinend nicht ausreichend vorhandenen Gefrierschutz zurückzuführen sind. Whittinghman, Leibo und Mazur (1972) stellten weiterhin fest, daß die Ergebnisse mit Gylzerin nur halb so gut waren, wie die Ergebnisse mit DMSO.

Es gibt nicht sehr viele Arbeiten in der Literatur, die sich mit Glyzerin als Kryoprotektivum beschäftigen, da doch im Großen und Ganzen mit DMSO größere Erfolge erzielt wurden. Die Ergebnisse von Miyamoto und Ishibashi (1981) die auch mit 1 molarer Glyzerinlösung und hohen Umsetztemperaturen (-79°C) experimentierten ragen mit einer Überlebensrate von 74% und einer Geburtenrate von 28% aus den anderen gefundenen Ergebnissen heraus. Auch Görding (1980) erzielte mit 1 molarer Glyzerinlösung als Kryoprotektivum die beachtliche in-vitro-Überlebensrate von 78%.

Bei allen mit Glyzerin durchgeführten eigenen Versuchen mißglückte der Transfer. Bei einem Teil der Mäuse konnten zwar Implantationen festgestellt werden, die jedoch nie zu Ende ausgetragen wurden. Nach spätestens 2 Wochen waren die Embryonen resorbiert.

Auch bei Miyamoto und Ishibashi (1981) und GÖrding (1980) betrugen die in-vivo-Überlebensraten nur 28% bzw. 25%. Auf Grund des relativ großen Unterschiedes zwischen in-vitro- und in-vivo-Überlebensraten beim Kryoprotektivum Glyzerin muß man davon ausgehen, daß die Embryonen latent geschädigt werden, sodaß sie zwar implantieren jedoch später resorbiert werden.

Wesentlich bessere Ergebnisse konnten mit DMSO erzielt werden. Bei diesen Versuchen war das Ergebnis von der Wahl der Umsetzungstemperatur und der Wahl der Auftaumethode deutlich abhängig. Tabelle 11 zeigt die Zusammenstellung der Ergebnisse mit einer Umsetzungstemperatur von -80°C , bei einer DMSO-Konzentration von 1,5 unter verschiedenen Auftaumethoden.

Tabelle 11:
Vergleich der Ergebnisse mit einer Umsetzungstemperatur von -80°C , DMSO-Konzentration von 1,5, verschiedene Auftaumethoden

Auftaumethode	Anzahl eingefror. Embryonen	Anzahl gefunden. Embryonen	Anzahl morph. intakter Embryonen		Anzahl der Geburten	
	Nr.	Nr.	Nr.	%	Nr.	%
$+20^{\circ}\text{C}$	33	32	16	50	1	6,25
Comput.	67	57	0	0	0	0

Die beim Auftauvorgang mit dem Computer erreichten Geschwindigkeiten von ca. $2,3^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ zeigten hinsichtlich der Überlebensraten der Embryonen wenig Erfolg. Vergleicht man dies mit den Ergebnissen anderer Autoren, die mit langsamen Auftausgeschwindigkeiten zwischen $3,5^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ und $15^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ arbeiteten, so ist offensichtlich, daß auch beim Auftauen Mindestgeschwindigkeiten einzuhalten sind (Whittingham, Leibo und Mazur 1972; Wilmut 1972; Schneider, Hahn und Sulzer 1974; Whittingham 1975; Forgrave, Rajamahendran und Baker 1977; Miyamoto und Ishibashi 1981). Da die Ergebnisse mit schnellen Auftausgeschwindigkeiten von $200-400^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ wesentlich erfolgversprechender sind, wäre es auch vom arbeitstechnischen Aufwand her wenig sinnvoll, das kompliziertere Verfahren des computer-gesteuerten Auftauvorganges noch weiter zu verfolgen. Dem Auftauen im Wasserbad von $+20^{\circ}\text{C}$ ist klar der Vorzug zu geben. In-vitro-Überlebensraten von 50% und eine Geburtenrate von 6,25% zeigen jedoch, daß auch hier noch nicht die optimale Methode gefunden ist.

Betrachtet man die Ergebnisse der Versuche mit höheren Umsetztemperaturen von -30°C bzw. $-37,5^{\circ}\text{C}$ bei einer DMSO-Konzentration von 1,25, so erkennt man die Vorteile dieser Methode (Tabelle 12).

Tabelle 12:

Vergleich der Ergebnisse mit einer Umsetztemperatur von -30°C bzw. $-37,5^{\circ}\text{C}$, DMSO-Konzentration von 1,25, verschiedene Auftaumethoden

Umsetz- temp./ Auftau- methode	Anzahl eingefror. Embryonen	Anzahl gefunden. Embryonen	Anzahl morph. intakter Embryonen		Anzahl der Geburten	
	Nr.	Nr.	Nr.	%	Nr.	%
$-37,5^{\circ}\text{C}$ $+40^{\circ}\text{C}$	211	154	50	32,4	6	12
-30°C $+15^{\circ}\text{C}$	317	262	201	76,7	23	12,9

Den doch signifikanten Unterschied in den in-vitro-Überlebensraten von 32,4% bei einer Umsetztemperatur von $-37,5^{\circ}\text{C}$ gegenüber 76,7% bei einer Umsetztemperatur von -30°C kann man wohl dadurch erklären, daß bei letzterer Methode eine andere Art des Hinzufügens und des Auswaschens des Kryoprotektivums gewählt wurde. So zeigte sich, daß dem langsamen Äquilibrieren der Embryonen mit verschiedenen Konzentrationen des Gefrierschutzmittels der Vorzug zugeben ist gegenüber dem einmaligen Hinzufügen des Kryoprotektivums. Auch das fraktionierte Ausverdünnen der Embryonen aus der Gefriermittellösung nach dem Auftauen ist sicher von Bedeutung bei den guten Ergebnissen dieser Methode.

Einen weiteren Beweis dieser These lieferte die gleiche Geburtenrate bei beiden Versuchsanordnungen. So ist die Behandlung der Embryonen mit der Inkubationsmethode sicher schonender für die Mehrzahl der Embryonen, die Qualität der überlebenden Zellen wird jedoch nicht beeinflusst.

Auf Laparotomien zur Feststellung der Implantationsrate wurde bei den Versuchen bewußt verzichtet, da nur lebend geborene Junge den Erfolg einer Methode beweisen sollten. Die in der Literatur häufig verwendeten Implantationsergebnisse zeigen meines Erachtens ein falsches Bild über den Erfolg einer Methode auf. Da letztendlich das Ziel aller Arbeiten über dieses Thema lebende Nachkommen ist, kann nur die tatsächliche Geburtenrate den Erfolg einer Methode widerspiegeln. Hier muß natürlich erwähnt werden, daß das Versuchstier Maus spezielle Schwierigkeiten bereitet und den Erfolg einer Methode verfälschen kann. Um diese Thesen zu beweisen wurden bei einem Teilkollektiv Laparotomien durchgeführt, um einen Vergleich der ursprünglichen Implantationsrate zur tatsächlichen Geburtenrate zu erhalten. Der Unterschied von fast 20% von einer Implantationsrate von 45,1 zu einer tatsächlichen Geburtenrate von 16,1 aus diesem Kollektiv zeigt doch die

Schwierigkeiten dieser Experimente in Bezug auf das Versuchstier Maus. Es ist außerordentlich schwierig, ja fast unmöglich den Zyklus der Maus genau zu erkennen und den optimalen Zeitpunkt des Transfers zu wählen. Auch der Transfer durch Einspülen der Embryonen in die Uterushörner ist sicher mit gewissen Verlusten an Zellen verbunden. Weitere Schwierigkeiten ergeben sich durch die Ungewißheit des genauen Geburtstermins. So konnte teilweise beobachtet werden, daß bei einer sehr geringen Zahl an Nachkommen, diese sofort nach der Geburt von dem Muttertier aufgefressen wurden und somit also nicht mehr gezählt werden konnten.

Abgesehen von den, das Versuchstier Maus betreffenden Schwierigkeiten, muß man jedoch auch damit rechnen, daß die Embryonen durch die Kryokonservierung so geschädigt wurden, daß sie zwar noch zur Implantation gelangten, jedoch auf Grund ihrer nicht vollständigen Intaktheit später resorbiert wurden.

Sind auch bei anderen Autoren die Geburtenraten mit z.B. 25% bei Schneider, Hahn und Sulzer (1974) oder mit 30% bei Görding (1980) etwas höher, so ist auch dies kein ausreichender Beweis für die absolute Gültigkeit der gewählten Methoden.

Abschließend kann man wohl sagen, daß die Versuche mit dem Kryoprotektivum DMSO, Umsetzungstemperaturen von -30°C , Auftaugeschwindigkeiten von $200-400^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ und Zugabe des Gefrierschutzmittels mit der Inkubationsmethode die besten Ergebnisse erzielten. Dies ist besonders auch in wirtschaftlicher Hinsicht von Bedeutung, da der Zeitaufwand bei Einfriervorgängen bis -30°C oder $-37,5^{\circ}\text{C}$ wesentlich kleiner ist als bei Umsetzungstemperaturen von -80°C .

Insgesamt gesehen muß jedoch auch diese Methode noch weiterhin verbessert werden um noch sicherere reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Beim Versuchstier Maus werden hinsichtlich der Transferergebnisse keine sehr viel besseren Resultate zu erzielen sein, da hier die bereits genannten Schwierigkeiten sehr schwer zu beseitigen sind. Auch spielt die hohe Verlustrate während der verschiedenen Arbeitsvorgänge eine große Rolle bei der Festsetzung der endgültigen Überlebensraten. Verlust an Embryonen sind zu beklagen beim Auftauen und Ausverdünnen aus dem Gefrierschutzmittel, außerdem beim Einspülen der Embryonen in den Uterus der Ammenmaus. Es gibt auf dem Gebiet der Kryokonservierung von Embryonen

noch verschiedene Unsicherheitsfaktoren zu klären.

Trotz der Beobachtung von 4 Nachfolgegenerationen nach einer Embryotransfergeneration, die sich äußerlich als gesund und normal fertil erwiesen, kann eine endgültige Aussage über einen sicheren Ausschluß einer bei der Kryokonservierung stattgefundenen Genomänderung nicht getroffen werden.

In diesem Zusammenhang muß man sagen, daß es zum momentanen Zeitpunkt noch nicht verantwortbar wäre, die Kryokonservierung bei humanen Embryonen einzusetzen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Für die Tiefgefrierkonservierung von Mäuseembryonen wurden im Vergleich die Gefrierschutzmittel DMSO und Glyzerin bezüglich ihrer Konzentration, verschiedener Umsetztemperaturen in flüssigen Stickstoff und verschiedener Auftaumethoden erprobt.

1. Werden die Embryonen mit 1,5 molarem DMSO behandelt und bei einer Temperatur von -80°C in flüssigen Stickstoff umgesetzt, nach Einfriergeschwindigkeiten von $0,33^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$, so erweist sich schnelles Auftauen mit Geschwindigkeiten von $200-400^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ als weitaus erfolgreicher (in-vitro-Überlebensrate 50%, Geburtenrate 6,25%) als langsames Auftauen mit Hilfe des computergesteuerten Einfriergerätes und Auftaugeschwindigkeiten von $2,3^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ (alle Embryonen wurden geschädigt).

2. Die Behandlung der Embryonen mit 1,25 molarem DMSO, Umsetztemperaturen von -30°C bzw. $-37,5^{\circ}\text{C}$, Einfriergeschwindigkeiten von $0,31$ und $0,34^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ und Auftaugeschwindigkeiten von $200-400^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ zeigt mit in-vitro-Überlebensraten von 32,4% und einer Geburtenrate von 12% gute Ergebnisse.

3. Werden die Embryonen langsam mit dem Gefrierschutzmittel inkubiert und nach dem Auftauen fraktioniert aus der Gefriermittellösung herausgeführt, so kann eine Optimierung der unter Punkt 2 genannten Methode mit in-vitro -Überlebensraten von 76,7% erreicht werden. Die Geburtenrate (12,9%) wird kaum beeinflusst.

Die bei dieser Versuchsanordnung durchgeführten Laparotomien am 12. Trächtigkeitstag ergaben eine Implatationsrate von 45.1%.

4. Für das Gefrierschutzmittel Glyzerin gilt, daß eine Mindestkonzentration von 1 molar eingehalten werden muß.

5. Bei den Versuchen mit 1 molarem Glyzerin ist kein Unterschied festzustellen hinsichtlich der in-vitro-Überlebensrate (38,6% bzw. 36,8%) nach einer Umsetztemperatur von -35°C und Auftauen im Wasserbad mit Auftaugeschwindigkeiten von $200-400^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ oder einer Umsetztemperatur von -80°C und anschließendem computergesteuertem Auftauen mit Geschwindigkeiten von $2,5^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$

6. Bei den mit DMSO behandelten Embryonen kam es zu insgesamt 30 lebenden Nachkommen, bei den mit Glyzerin behandelten Embryonen wurden keine lebenden Nachkommen produziert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Burks, J.L., Davis, M.E., Bakken, A.H. u. Tomasovic, J.J. (1965):
Morphologic evaluation of frozen rabbit and human ova.-
Fertility & Sterility 16, 638-641
- Forgrave, L.F., Rajamahendran, P. u. Baker, R.D. (1977):
Cryopreservation of mouse embryos in Macdonald freeze-thaw
apparatus. - Can. J. Anim. Sci. 57, 389-394
- Görding, G. (1980): Versuche zur Tiefgefrierkonservierung von
Mäuseblastocysten mit Glycerin als Gefrierschutzmittel. -
Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Kasai, M., Niwa, K. u. Iritani, A. (1980): Survival of mouse
embryos frozen and thawed rapidly. - J. Reprod. Fert. 59,
51-56
- Leibo, S.P. (1977): Fundamental cryobiology of mouse ova and
embryos. - In: Elliott, K. u. Whelan, J. (Hrsg.): The freezing
of mammalian embryos. (Ciba Fdn. Symp. No. 52) Elsevier,
Amsterdam, 69-96
- Lovellock, J.E. (1954a): Physical instability and thermal shock
in red cells. - Nature 173, 659
- Lovellock, J.E. u. Bishop, M.W.H. (1959): Prevention of freezing
damage to living cells by dimethylsuloxide. - Nature 183,
1394
- Mazur, P. (1963): Kinetics of water loss from cells at subzero
temperature and the likelihood of intracellular freezing. -
Journ. Gen. Physiology 47, 347-369

- Mazur, P. (1970): The freezing of biological systems (Living cells to ice formation) - Science 168, 939-949
- Miyamoto, H. u. Ishibashi, T. (1981): Effects of the temperature of ice-seeding on survival of frozen and thawed mouse morulae. - Experientia 37, 187-188 Birkhäuser Verlag, Basel (Schweiz)
- Parkening, T.A. u. Chang, M.C. (1977): Effects of cooling rates and maturity of the animal on the recovery and fertilization of frozen-thawed rodent eggs. - Biology of Reprod. 17, 527-531
- Polge, C., Smith, A.U. u. Parkes, A.S. (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. - Nature, London, 164, 666
- Schneider, U., Hahn, J. u. Sulzer, H. (1974): Erste Ergebnisse der Tiefgefrierkonservierung von Mäuse- und Kanincheneizellen. - Dtsch. Tierärztl. Wschr. 19, 470-472
- Sherman, J.K. u. Lin, T.P. (1958b): Survival of unfertilized mouse eggs during freezing and thawing. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98, 902-905
- Sherman, J.K. (1963): Questionable protection by intracellular glyzerol during freezing and thawing. - J. cell. Comp. Physiol. 61, 67-82
- Whittingham, D.G., Leibo, S.P. u. Mazur, P. (1972): Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . - Science 178, 411-414

- Whittingham, D.G. (1975): Survival of rat embryos after freezing and thawing. - J. Reprod. Fert. 43, 575-578
- Whittingham, D.G. (1977a): Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. - In: Elliott, K. u. Whelan, J. (Hrsg.): The freezing of mammalian embryos. (Ciba Fndn. Symp. No. 52) Elsevier, Amsterdam, 97-127
- Whittingham, D.G. (1978): Symposium on freezing of ova and embryos - synopsis papers. - Cryobiology 15, 367-369
- Whittingham, D.G., Wood, M., Farrant, J., Lee, H. u. Halsey, J.A. (1979): Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C . - J. Reprod. Fert. 56, 11-21
- Wilmut, J. (1972): The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. - Life Science Vol. 11 Part. II, 1071.1079

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. S. Trotnow,
Universitätsfrauenklinik Erlangen, für die Überlassung
des Themas und die freundliche Unterstützung und Beratung.

Herrn Prof. Dr. K.G. Ober, Direktor der Universitätsfrauen-
klinik Erlangen, danke ich für die freundliche Überlassung
des Arbeitsplatzes.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. S. Al-Hasani, Frau Knie-
wald und Frau Sosnitza für die jederzeitige Hilfsbereit-
schaft.

LEBENS LAUF

- 1953 am 15.10.1953 wurde ich, Margit Köhnlein-Rühl, als erste Tochter der Eheleute Johann Wilhelm und Ingeborg Köhnlein, geb. Hirschmann, in Nürnberg geboren
- 1973 Abitur an der Wilhelm-Löhe-Schule in Nürnberg
- 1975 - 1977 Studium der Medizin in Ferrara/Italien
- 1977 - 1982 Studium der Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen-Nürnberg
- 1982 12.März 1982 Heirat mit Herrn Dr.rer.nat. Dr. med. Hermann Rühl
- 1982 21.Juli 1982 Geburt unseres Sohnes Johann Maximilian
- 1982 24. November 1982 Approbation als Arzt
- 1983 seit 1.Juli Tätigkeit als Assistenzärztin am Kreiskrankenhaus Neustadt/Aisch

